

氏 名 千 葉 隆 司

学位(専攻分野の名称) 博 士 (農芸化学)

学 位 記 番 号 乙 第 921 号

学 位 授 与 の 日 付 平成 29 年 2 月 20 日

学 位 論 文 題 目 食品の安全性確保のための迅速・精確な微生物検出法の構築
に関する基礎的研究

論 文 審 査 委 員 主査 教 授・農 学 博 士 五十君 静 信
教 授・博士(農芸化学) 内 野 昌 孝
教 授・医 学 博 士 中 江 大
農 学 博 士 安 藤 勝 彦*

論文内容の要旨

東京都は、人口 1,300 万人を超える日本を代表する都市である。また、世界経済を牽引する国際的大都市でもあるが、そこで生活する都民にとっては生活の基礎が「衣・食・住」であることに変わりない。その中でも、特に「食」については健康な暮らしの実現において重要であるが、東京都では毎年、約 3,000 人の都民が食品事故によって何らかの健康被害を受けていることが報告されている。また、東京都が実施した世論調査においても食の安全情報に対する関心が高く、行政には効果的な食の安全対策の構築が強く求められている。

その一方で、東京都の食品事情を考えると、都の人口規模と食料自給率から大量の食品が海外を含む都外から流入している現状が伺える。また、これらの中には長期間の輸送や複雑な経路を経て流通している食品も多数存在する。このような現状において食の安全を確保していくためには、「事故事例における原因究明」と「市販流通品の安全性」の 2 つの面について国内外の状況を幅広く把握し、迅速に対応できる体制の構築が必要である。

食品の安全性は、化学・微生物の両面から確保していくことが必要であるが、都内で発生した食中毒の 90% 以上に微生物が関与している実態から、微生物による食品汚染は食品衛生において重大な脅威と考えられる。微生物に起因する諸問題のうち、現在生じている具体例として、例えば酵母による食品の腐敗・変敗では、消費者が異常を判別できずに誤って食べてしまう例が散見される上、喫食により健康被害に至る比率が高くなることが示されている。また、長期の保存や流通が見込まれる輸入農産物の一部では防カビ剤が使用されているが、諸外国では農場で発生した防カビ剤抵抗性株が農場外に拡大していることが問題となっている。さらに、海外では死

亡事故も発生しているカビ毒・アフラトキシン (AF) による食品汚染問題では、2000 年代以降、汚染地域が熱帯・亜熱帯地域から温帯地域にまで拡大し、国内生産品での汚染も懸念されるようになった。これらに加え、加熱調理品での食中毒事故が多いセレウス菌食中毒については、欧米では毎年 100 名を超える患者が発生しており、国内でも過去には 300 名を超える事故が発生している。

このような食品汚染微生物の諸問題への対応では検査による安全性の確認が必要であり、食品が大量かつ広域に流通している現状では、より迅速で精確な検査法の開発が求められている。しかし、現在行われている微生物検査は培養法が中心であるために結果を得るまでに時間がかかること、また、一部の検査には高度な専門知識・技術や長年の経験が必要とされるなど、解決すべき課題が生じている。さらに、これら検査法における課題により、微生物の食品汚染実態が十分に把握できていない現状もある。

そこで本研究は、食品汚染酵母、AF 産生菌、セレウス菌食中毒について迅速性・精確性と実用性・簡便性を踏まえた検査法の見直しを実施した。また、微生物汚染の低減・予防に資する基礎的データ蓄積のために青果市場におけるカビ汚染実態の解明を行った。

1. 食品汚染酵母の同定法

食品汚染酵母の検査では、原因酵母の有害性確認や再発防止に必要な汚染経路の特定のために酵母の同定が求められる。しかし、検査で広く用いられている既存の同定キットは臨床由来の病原酵母用に開発されたものであり、食品汚染酵母を同定しにくいのが現状である。そこ

* 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 技監

で、市販の酵母同定キットに対する食品微生物同定の妥当性を検討するとともに、塩基配列解析法による酵母同定の精度を検証した。

酵母基準株 17 株と食品由来 67 株（計 84 株）を使用し、現在、広く利用されている市販酵母同定キット（API 20C AUX）と近年利用され始めた rRNA 遺伝子の塩基配列解析法（Large subunit (LSU)：大サブユニット/Internal transcribed spacer (ITS)：内部介在配列）による同定の結果を比較した。基準株での検討では、API 20C AUX で菌名が一致した株は 10 株であり、その同定確率 (%id) は全て基準とされる値 (80%id) 以上を提示し、平均 99.3%id であった。一方、属までの同定に留まった 2 株を除き、5 株が属あるいは種レベルで異なる菌名を提示した。これら不一致 5 株のうち、3 株は 80%id 以下を示したが、2 株 (*Candida pseudointermedia* / *Pichia subpelliculosa*) が 94%id 以上の高い同定確率で異なる菌名を提示し、基準値を適用した場合は誤同定になることが判明した。他方、塩基配列解析については LSU 領域では供試全株で菌名が一致したが、近縁種との塩基差異が 1% 以下で明確な形で区別できない株が 9 株認められた。また、ITS 領域では近縁種との塩基差異 1% 以下の株が 4 株に減少した一方で、*C. pseudointermedia* については別の近縁種が提示された。原因を精査した結果、本菌の ITS 領域の配列が公共データベースに未登録であることが判明し、本菌については基準株から新たに取得した配列データを利用することで対応した。これらの結果から、塩基配列解析法では ITS 領域のデータ不足を考慮し、LSU を中心に解析を行い、塩基差異 1% が認められた場合は ITS で確認する 2 領域の併用法が有用と考えられた。

以上の結果を踏まえ、食品から分離した 67 株で比較を行った。この結果、API 20C AUX と塩基配列解析の菌名が種レベルまで一致した株は 37 株であり、うち 31 株は 90%id 以上を示した。一方、不一致株 30 株については、基準値 80%id 以上の同定確率を示した株が 17 株認められ、また 90%id 以上を示した株は 6 株 4 菌種 (*Candida picinguabensis* / *C. intermedia* / *C. sake* / *C. metapsilosis*) であった。この結果から、食品由来酵母の同定において基準値を適用した場合、特に種レベルまで同定する場合は誤同定の確率が増加することが判明した。

以上の結果から、API 20C AUX を使った食品由来酵母の同定で精度を上げるためには、同定確率の基準値を上げることが有効であったが、設定を上げ過ぎると適用できる株数が減少する。そこで同定確率 90%id 以上を 1

つの目安にする方法が有用であると考えられた。また、この基準に該当しない 6 菌種（基準株 2 菌種、食品由来株 4 菌種）を同定する場合は、ITS 領域を含む塩基配列解析法で確認が必要と考えられた。

2. 青果市場のカビ汚染と防カビ剤抵抗性株

長期の保存や流通が見込まれる柑橘類では、収穫・選果後の流通段階でカビが発生する「市場病害」が問題となっている。現在、市場病害防止のために防カビ剤が使用されているが、諸外国では農場で発生したと考えられる防カビ剤抵抗性株が選果場まで拡大していることが報告されている。一方、我が国ではこれら防カビ剤抵抗性株について農場以外での実態が把握できていない。そこで本研究では、青果市場内のカビ汚染と防カビ剤チアベンダゾール (TBZ) 抵抗性株の分布について確認を行った。

都内の青果市場（2 施設）を対象に、場内のカビ汚染と使用頻度が高い TBZ に対する抵抗性を確認した。市場内の落下真菌（5 定点×3 回）と清掃用タオル（3 検体）、腐敗柑橘類（16 検体）を試料とし、検出された菌の同定は従来からの形態観察に加え、食品汚染酵母の同定法で検討した rRNA 遺伝子 (ITS 領域) の塩基配列解析法を併用した。また、TBZ への抵抗性確認はディスク拡散法と TBZ の作用部位である β -チュブリン遺伝子の塩基配列解析を用いた。

市場内のカビ汚染を確認した結果、全試料の 70% 以上から *Penicillium* 亜属が検出され、特に柑橘類の病害菌である *Digitata* 節（カンキツ緑カビ病菌）の検出頻度が高い傾向が示された。この結果を踏まえ、*Digitata* 節を対象に防カビ剤 TBZ への抵抗性を確認した。ディスク法と β -チュブリン遺伝子の配列を解析した結果、ディスク法で抵抗性を示した全株で 200 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからチロシンに変わる F200Y 変異が認められた。この結果を基に、市場内から検出された 27 株の *Digitata* 節について F200Y 変異を指標に TBZ への抵抗性を推定した結果、全体で 70% 以上、輸入柑橘類に限っては 90% 弱が TBZ 抵抗性株であると推定された。以上の結果は、国内においても諸外国同様に防カビ剤耐性株の分布が農場外にまで拡大していることを示唆し、防カビ剤の使用や選択を行う上での基礎的なデータを提示するとともに市場病害低減の一助にもつながると思われた。

3. カビ毒（アフラトキシン）産生菌の簡易検出法

アフラトキシン (AF) は、カビが産生する強い発が

ん性カビ毒である。国内では AF による急性中毒の事例は報告されていないが、海外では 100 名以上の死者を出す大規模な急性中毒事故が発生している。したがって、食品の AF 汚染対策は食品衛生における重要な課題の 1 つであるが、現時点では食品中で産生された AF は除去が困難である。そこで、AF 汚染防除においては食品で AF を産生させないことが求められ、そのためには AF 産生菌の存在を的確に把握することが重要となる。食品の AF 汚染に関与する AF 産生菌としては、*Aspergillus* 属 *Flavi* 節の *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* が知られている。しかし、本節には形態が酷似し区別が難しい麹菌 (*A. oryzae*) を始めとする有用菌が含まれている上、AF の産生性は菌株レベルで異なり、外観から区別は不可能である。そこで本研究では、AF 産生菌検査方法として、分子系統樹による解析とマルチプレックス PCR による簡易識別方法を検討した。

Aspergillus 属の分離・保存菌株を使用し、培養法と分子系統樹による解析の比較を行った。分子系統樹解析では、食品汚染酵母や青果市場のカビ汚染で利用した rRNA 遺伝子の ITS (ITS-1/2) 領域と AF 産生に関与する遺伝子群の一部である *afIR*-*afIJ* intergenic spacer (*afIR*/J-IGS) 領域の塩基配列を使用した。20 株の *Flavi* 節を用いた予備実験では、ITS-1/2 領域を用いた系統樹解析では B/G 群産生 *A. nomius*, B/G 群産生 *A. parasiticus*, *A. flavus* の 3 クラスターが形成されたが、このうち *A. flavus* クラスターでは有用菌 *A. oryzae* を含む AF 非産生株を区別できなかった。一方、*afIR*/J-IGS 領域では 4 つのクラスターを形成し、ITS-1/2 領域では区別できなかった *A. flavus* のクラスターについて B 群産生株と有用菌を含む非産生株を区別できることが判明した。この結果は、AF 産生株の識別には *afIR*/J-IGS が有用であることを示唆した。

以上を基に、*afIR*/J-IGS 領域の分子系統樹での各クラスターを特異的に検出するマルチプレックス PCR を検討した。*Aspergillus* 属 49 株を使用して検討した結果、*Flavi* 節と他の *Aspergillus* 属が区別可能であった。また、*Flavi* 節については 8 株を除き分子系統樹解析と同様に AF 非産生株と産生株を区別し、かつ、AF の産生性と産生種別を簡易な形で検出できることを示唆する結果が得られた。一方、マルチプレックス PCR で検出できなかった 8 株は、*afIR*/J-IGS の分子系統樹上ではサブクラスターに帰属する株であり、これらの株は分子系統樹上では識別可能であることが判明した。以上の結果から、本研究で検討したマルチプレックス PCR と分子系統解析の併用により、AF 産生菌を迅速簡易に検

出・識別できることが示された。

4. 食中毒毒素（セレウス菌嘔吐毒素）の検出法

セレウス菌は毒素型食中毒の原因菌であり、我が国では加熱調理食品での食中毒事例が多く、過去には死亡事故も発生している。また、我が国での本菌食中毒は嘔吐毒素（セレウリド）によるものとされている。一方、現行のセレウリド検出法では、培養細胞を用いたバイオアッセイ法（HEp-2 細胞の空胞化試験：参照法）が用いられている。しかし、本法は生細胞の特異的な変性を目視で確認する方法であることから、客観性や再現性、迅速性の面に課題があり、食中毒検査に必要な多検体処理にも不向きである。このような背景を踏まえ、本研究ではセレウリドの検出方法として既存のバイオアッセイ法の簡便化と機器分析による方法を検討した。

バイオアッセイ法の簡便化では、参照法の欠点を補うために先行研究で検討されたテトラゾリウム塩 MTT を利用した方法（MTT 法）をさらに改良し、より簡便で参照法との併用も可能な水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 の発色を利用した比色判定法（比色法）を検討した。分離菌株からのセレウリドの検出（セレウリド産生試験）において、新規比色法は MTT 法と比べて遜色なく、また、参照法との間にも良好な相関 ($r^2=0.905$) が認められた。

機器分析による検出では、先行研究を参考に放線菌が産生する抗生物質の一種・バリノマイシンを代替標準品とした質量分析法（LC-MS 法）を検討した。また、セレウリド産生試験では参照法での標準培地（スキムミルク培地）を新たに作成した芽胞形成培地（NB+Mn 培地）に変更した方法を検討した。その結果、バリノマイシン換算による本法の検出感度は参照法とほぼ同等（約 5ng/mL）であり、定量性については 10-1000ng/mL の範囲が得られた。以上の結果から、新たなセレウリド検出法として構築した比色法と LC-MS 法は、セレウス菌食中毒検査の簡便化と精度の向上に寄与できると考えられた。

総括

本研究では、現在、食品の衛生や安全性の面から問題となっている微生物について、検査法の改善と実態の把握を行った。

食品中の汚染酵母同定法では、簡便かつ汎用性の高い同定キットを用いた場合では、より高い基準を適用することで種レベルの同定を行えることを提案し、酵母の同定精度を上げるために近年、利用が進みつつある塩基配

列解析法の導入も提案した。同様に、カビ毒産生菌の同定と毒素生産の有無においても簡便かつ導入可能なマルチプレックス PCR と系統樹解析を提案し、セレウス毒素の検出においても再現性や客観性の面で優れ、かつ既存の方法と併用可能な試験法を新たに構築した。

近年、食品の生産技術の進歩や新たな流通システムの普及により、国内外から新鮮な食材が素早く入手できるようになった。これにより、我々の食生活は大変便利になったが、その一方で、食品が大量かつ広域に流通する現状は、食品を介した健康被害を拡大するリスクも含んでいる。このような食品の安全性確保においては生産から消費までの総合的な管理が求められ、行政にはその対応策の1つとして食を取り巻く環境変化に合わせた検査

方法の改善も求められている。本研究では、このような要望に対して従来法を改善し、かつ、簡便な手法も提案した。加えて、諸外国で問題になっている防カビ剤耐性菌については、国内の市場内において柑橘類由来と考えられる TBZ 抵抗性の *Digitata* 節の汚染が顕著であることを見出し、我が国でも諸外国同様に防カビ剤耐性株が農場外に拡大している可能性を初めて示した。

以上、「食品の事故事例における原因究明と食品の流通段階における微生物汚染の実態把握」という本研究で得られた成果の利用推進が、微生物に起因した食品衛生に関する問題に対して解決策の一助になると考えられる。そして、これらの成果が食を通じた都民の健康維持増進に繋がることを期待する。

審査報告概要

本研究では、現在、食品の衛生や安全性の面から問題となっている微生物について、検査法の改善と実態の把握を行った。食品汚染酵母同定法では、簡便で汎用性の高い同定キットを用い、高基準を適用することで種レベルの同定を行えることを提案し、酵母の同定精度を向上のため近年、利用が進む塩基配列解析法の導入も提案した。同様に、カビ毒産生菌の同定と毒素生産の有無においても簡便かつ導入可能なマルチプレックス PCR と系統樹解析を提案し、セレウス毒素の検出においても再現性や客観性の面で優れ、かつ既存の方法と併用可能な試験法を新たに構築した。食品が大量かつ広域に流通する

現状は、食品を介した健康被害を拡大するリスクを含み総合的な管理が求められる。このような要望に対して従来法を改善し、かつ、簡便な手法も提案した。加えて、諸外国で問題になっている防カビ剤耐性菌については、国内の市場内において柑橘類由来と考えられる TBZ 抵抗性の *Digitata* 節の汚染が顕著であることを見出し、我が国でも諸外国同様に防カビ剤耐性株が農場外に拡大している可能性を初めて示した。以上は現場に即した実践的な研究であり、学術的にも評価が高い。よって、審査員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。